Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein

ERHÖHUNG DER IMMUNANTWORT VON MÄUSEN AUF SRBC DURCH PENTOSANSULFAT (SP_{54})

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Clemens Stork
aus Herzebrock

1975

Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein

ERHÖHUNG DER IMMUNANTWORT VON MÄUSEN AUF SRBC DURCH PENTOSANSULFAT (SP_{54})

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Clemens Stork
aus Herzebrock

Referent: Prof. Dr. rer. nat. T. Diamantstein

Korreferent: Prof. Dr. I. Hoppe

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität

Promoviert am: 25.2.75

UNIV. LEIDEN BIBL.

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	1
2. Aufgabenstellung	7
3. Material und Methoden	8
3.1. Versuchstiere	8
3.2. Verwendete Materialien	8
3.2.1. Antigen	8
3.2.2. Adjuvans	8
3.2.3. Medium	9
3.2.4. Pufferlösung	9
3.2.5. Agarlösung	9
3.2.6. Komplement	10
3.2.7. Anti-Maus-Gammaglobulinserum	10
3.2.8. Kaninchenserum	10
3.2.9. 2-Mercaptoäthanol	10
3.2.10. Bestimmung der prozentualen Hemmung von Antikörper-bildenden Zellen durch anti-Gammaglobulinserum	11
3.3. Immunisierung	11
3.4. Bestimmung der Anzahl Antikörper-bildender Zellen in der Milz	12
3.5. Bestimmung der Titer hämolysierender und hämagglutinierender Antikörper	14
3.6. Statistische Auswertung	16
4. Ergebnisse und Diskussion	17
4.1. Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Applikation von SP_{54} im Verhältnis zum Zeitpunkt der Immunisierung	17

Seite

4.2. Dosisabhängigkeit der Wirkung von SP_{54} auf die Immunantwort 18

4.3. Einfluß von SP_{54} auf die Stimulierung der Immunantwort bei Mäusen, die mit verschiedenen Dosen Antigen (SRBC) immunisiert wurden 19

4.4. Einfluß des Applikationsweges von SP_{54} und Antigen (SRBC) auf die Immunantwort 21

4.5. Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort 22

5. Zusammenfassung 45

6. Literaturverzeichnis 47

1. Einleitung

Ein Adjuvans (L. : adjuvare - helfen) ist eine Substanz, die unter anderem in der Lage ist, die Produktion spezifischer Antikörper oder den Sensibilisierungsgrad gegen ein Antigen zu verstärken, wenn sie mit dem Antigen gemeinsam oder auch von ihm getrennt verabreicht wird.
Zur Erhöhung des Antikörpertiters und zur Verstärkung des Immunitäts-Schutzes wurde eine große Anzahl unterschiedlichster Substanzen bereits seit längerer Zeit auf medizinischem Gebiet praktisch genutzt. Einige Beispiele solcher Adjuvantien: Aluminiumhydroxyd, Aluminiumphosphat, Emulsionen von Mineralölen, Siliciumdioxyd, Saponin, Vitamin A, Kollodium etc., Substanzen also, die gemäß ihrer Struktur keiner einheitlichen Stoffklasse zuzuordnen sind, was für die zufällige Entdeckung dieser Substanzen spricht.

Im Gegensatz dazu hat sich in letzter Zeit eine Reihe von Substanzen, die alle ein entscheidendes Merkmal gemeinsam haben (die polymere Matrix und den anionischen Charakter) als äußerst wirksam gezeigt in Bezug auf die Stimulierung der humoralen Immunantwort.
Gemeint sind Substanzen wie natürliche und synthetische Poly- und Oligonukleotide (1), Polyacrylsäure (2), Dextransulfat (3), Polymannuron-Guluronsäure (4). Poly-D- Glutaminsäure und Poly-L-Glutaminsäure (5), Polyäthylensulfat (6). Oxydierte Cellulose (7), Hyaluronsäure und Pectin (8).

Das hier zu untersuchende Pentosansulfat (SP_{54}) erfüllt die o. a.

Voraussetzungen (polymere Matrix und anionischen Charakter), die an ein Adjuvans dieses Typs gestellt werden.

Auffällig ist, daß eine Reihe dieser Substanzen wie natürliche doppelsträngige Ribonukleinsäuren (9) Polyacrylsäure (10), einige sulfurierte Polysaccharide wie Dextran- Pullan- und Agarsulfat sowie SP_{54} (11) als potente Interferoninduktoren bekannt sind bzw. antivirale Aktivität aufweisen.

Über SP_{54} wurde kürzlich berichtet (12), daß es ebenso wie Heparin antikomplementäre Eigenschaften (Hemmwirkung der hämolytisch und esterolytisch aktivierten Komplementkomponente $C_{\bar{1}}$) besitzt und darüber hinaus durch seinen vasotropen Effekt und Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität markante antiphlogistische Eigenschaften zeigt (13).

Die Forschung der vergangenen Jahre hat gezeigt, daß zur Auslösung einer optimalen humoralen Immunantwort auf die meisten Antigene das Zusammentreffen immunkompetenter Lymphozyten und Makrophagen erforderlich ist (14, 15, 16, 17, 18). Die immunkompetenten Lymphozyten können auf der Grundlage funktioneller und morphologischer Unterschiede in zwei Zelltypen unterteilt werden, die T-Zelle und die B-Zelle.

T-Zellen sind Lymphozyten, die in allen lymphatischen Geweben, dem zirkulierenden Blut und dem Ductus thoracicus vorkommen

und morphologisch, wie mit Hilfe des Raster-Elektronenmikroskops (19) gezeigt werden konnte, durch eine glatte Oberfläche leicht von den B-Zellen zu unterscheiden sind (Abbildung 1). Die T-Zellen stammen aus der fetalen Leber und/oder dem Knochenmark (20, 21) und haben unter dem Einfluß der Thymus-Epithelzellen bestimmte spezifische Funktionen erlangt, die sie dazu befähigen, einerseits bei der Entwicklung humoraler Immunantwort gegen bestimmte Antigene eine entscheidende Rolle zu spielen (15, 22) andererseits die Vermittlung zellulärer Immunreaktionen (Entwicklung verzögerter Überempfindlichkeit, Abstoßung fremder Gewebstransplantate) zu übernehmen (21, 23). Diese Zellen produzieren selbst keine Antikörper, sind aber zumindest für eine Reihe von Substanzen, so z. B. Fremderythrozyten und die meisten Protein-Antigene der entscheidende Faktor bei der Auslösung spezifischer humoraler Immunität. Diese Antigene werden als Thymusabhängig bezeichnet.
Gerät ein solches Antigen mit den spezifischen Rezeptoren der T-Zelloberfläche in Kontakt, werden die Zellen des entsprechenden Klons einerseits zur Vermehrung und Differenzierung (engl.: education) angeregt (24), andererseits solchermaßen aktiviert, daß sie in der Lage sind, im Rahmen der humoralen Immunantwort Helfer-Zell-Funktion zu übernehmen. Die Natur dieser Helfer-Zell-Funktion der aktivierten T-Zelle bedarf noch endgültiger Klärung.

B-Zellen stammen ebenso wie die T-Zellen aus der fetalen Leber

und/oder dem Knochenmark und differenzieren sich bei Vögeln unter dem Einfluß der Bursa Fabricii, bei den Säugetieren unter dem Einfluß einer bislang noch hypothetischen analogen Gewebestruktur (21) zu den unipotenten Vorläuferzellen der Antikörper synthetisierenden und sezernierenden Plasmazellen. Die B-Zellen, die im Falle der Thymus-abhängigen Antigene der Mitwirkung der T-Zellen und u. U. der Makrophagen bedürfen, um in normalem Umfang (25) Antikörper zu produzieren, die wahrscheinlich identisch sind mit den Immunglobulinrezeptoren auf den Zelloberflächen des entsprechenden Klons, sind jedoch in der Lage, in Abwesenheit von T-Zellen mit einer optimalen und spezifischen Immunreaktion zu antworten. Solche Thymus-unabhängigen Antigene sind z. B. Pneumokokkenpolysaccharid S III (26), gereinigtes polymerisiertes Flagellin (POL) von Salmonella Adelaide (27) Escherichia coli Polysaccharid (28), Polyvinylpyrrolidin (28) und MS 2 Phagen (29). Auffallend ist, daß die Struktur dieser Antigene wie die oben erwähnter Adjuvantien mehr oder weniger identische linear angeordnete Einheiten aufweist.

Der dritte oben erwähnte Zelltyp ist der Makrophage, der ebnso wie die T-Zelle selbst keine Antikörper produziert, aber als unspezifische Komponente bei der humoralen Immunantwort unerläßlich zu sein scheint (30), wohingegen die Spezifität der Antwort von den B-Zellen bzw. den B- und T-Zellen bestimmt wird (31). Der Grad der Abhängigkeit des Erfolgs einer Immunantwort von der Aktion der Makrophagen (Antigen-Beseitigung. Antigen-Konzentrierung Antigen-Veränderung) ist von zahlreichen Faktoren u. a.

von den physikochemischen Eigenschaften des Antigens abhängig (30).

In dieses System von immunkompetenten Zellen greifen die Adjuvantien ein. Die Wirkung dieser Substanzen scheint im Falle der Thymusabhängigen Substanzen auf ihrer Fähigkeit zu beruhen, den normalen Einfluß von T-Zellen auf die Antikörperproduktion zu stimulieren oder zu ersetzen.
Von den Polyanionen Polyacrylsäure und Dextransulfat (32) wurde berichtet, daß sie bei erwachsen-thymektomierten, letal-bestrahlten, mit Knochenmarkszellen geschützten Mäusen die Fähigkeit sowohl der IgM- als auch der IgG-Antikörperbildung wiederherstellten. Entsprechende Versuche in vitro (33) zeigen ähnliche Ergebnisse. Neuere Arbeiten (34, 35, 36, 37) zeigen, daß Polyanionen einschließlich einer Reihe doppel- oder einsträngiger Polynukleotide B-Zellmitogene sind. Diese Eigenschaft liefert eine mögliche Erklärung für ihre Fähigkeit unter bestimmten Voraussetzungen T-Zellen zu ersetzen. Dabei zeigt sich, daß der Grad der Aktivierung der DNA-Synthese in Milzzellen in vitro eng verknüpft ist mit ihrer Adjuvanswirkung in vivo (36). Von einigen Thymus-unabhängigen Antigenen ist bekannt, daß sie in vitro mitogen für B-Zellen sind (38) und ebenfalls T-Zellfunktion ersetzen können, da sie in T-Zell-freien Milzzellkulturen eine Antikörperbildung gegen T-Zell-abhängige Antigene ermöglichen. (39)
Untersuchungen von Poly-D-Glutaminsäure und Poly-L-Glutaminsäure (5) haben gezeigt, daß auch nicht-immunogene Substanzen bei der Immunantwort auf SRBC bei Mäusen mitogene Wirkung und Adjuvanswirkung zeigen.

Immunogenität ist also keine unbedingte Voraussetzung für die Adjuvanswirkung der Polyanionen, während mitogene Eigenschaften von entscheidender Bedeutung zu sein scheinen.

2. Aufgabenstellung

Es war von Interesse zu untersuchen, ob die therapeutisch genutzte Substanz SP_{54}, ein Polyanion von geringem Molekulargewicht (MG 2ooo), bestehend aus 6-12 Zucker-Einheiten und 2 Sulfatgruppen pro Pentose und im Molekulargewicht vergleichbar mit Oligonukleotiden, einen ebensolchen Einfluß auf die humorale Immunantwort hat wie von den o. a. Substanzen berichtet wurde. Darüberhinaus galt es, etwaige Charakteristika dieser Substanz aufzuzeigen.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an 6-8 Wochen alten, weiblichen, spf NMRI/HAN-Mäusen aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover durchgeführt.
Die Tiere erhielten Altromin R 10 Standardfutter und Wasser ad libitum.

3.2. Verwendete Materialien

3.2.1. Antigen

Verwendet wurden Hammelerythrozyten (SRBC=sheep red blood cells) der Behring-Werke, Marburg.
Nach Auswaschen des Stabilisators entsprechend den Angaben des Herstellers wurden die Erythrozyten durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung in Suspensionen unterschiedlicher Konzentration übergeführt.

3.2.2. Adjuvans

Als Adjuvans diente SP_{54} von der Firma Bene-Chemie GmbH, München. Die gewünschte Konzentration wurde durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

3. 2. 3. Medium

Eagle`s minimum essential medium + Hank`s Salze (mit Glutamin, ohne $NaHCO_3$) von der Firma Serva. Heidelberg, wurde mit in 3. 2. 4. beschriebener Pufferlösung zu einem hypertonen Medium gelöst. (10. 7 g MEM + 800 ml Pufferlösung)
Durch Verdünnung mit Aqua bidest. (100 ml hypertones Medium + 25 ml Aqua bidest.) wurde isotones Medium hergestellt.

3. 2. 4. Pufferlösung

Zur Herstellung des o. a. Mediums verwendete Pufferlösung. 358 mg Na_2HPO_4 x 12 H_2O und 200 mg $MgCl_2$ x 16 H_2O von der Firma Merck. Darmstadt, wurden in einem Mörser fein zerrieben und in 1 l Aqua bidest. gelöst.

3. 2. 5. Agarlösung

Verwendet wurde Agarose A-37 der Firma L`Industrie Biologique Francaise. Frankreich. Zur Herstellung der Agarlösung wurden 25o mg Agarose und 10 ml Aqua bidest. eine halbe Stunde im Wasserbad erhitzt und darauf mit 40 ml erwärmtem hypertonen Medium vermischt (0. 5 %-ige Agaroselösung).
Zur Vorbereitung der Objektträger für die Bestimmung der Antikörper-bildenden Zellen wurden die in Äthanol gereinigten Objektträger in 0. 1 %-ige Agaroselösung getaucht und 1

Stunde bei 80°C getrocknet.

3. 2. 6. Komplement

Verwendet wurde Meerschweinchenkomplement der Firma Behringwerke, Marburg. Eine Verdünnung im Verhältnis 1:5 mit isotonem Medium wurde zur Bestimmung der Antikörper-bildenden Zellen in der Milz benötigt, eine 10 %-ige Komplementlösung durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung zur Bestimmung der hämolysierenden Antikörper.

3. 2. 7. Anti-Maus-Gammaglobulin

Um mäusespezifisches anti-Gammaglobulinserum von der Firma Behring-Werke. Marburg von natürlichen., hämolysierenden Antikörpern zu befreien, wurden vor Gebrauch gleiche Volumina Antiserum und gepackter SRBC 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert und der Überstand verwendet.

3. 2. 8. Kaninchenserum

Normales Kaninchenserum der Firma Difco wurde vor Verwendung gleichartig behandelt.

3. 2. 9. 2-Mercaptoäthanol

Zur Bestimmung der 7 S-Antikörper mußten die Serum-ständigen 19 S-Antikörper durch eine 1-molare Lösung von 2-Mercaptoäthanol von der Firma Merck, Darmstadt, (0,7815 g = 0,705 ml 2-Mercaptoäthanol + Aqua bidest. ad 100 ml) eliminiert werden.

3.2.10. Einfluß des anti-Gammaglobulinserums auf den Nachweis der 19 S-PFC

3 Mäuse wurden mit $2x10^8$ SRBC/0.5 ml NaCl-Lösung immunisiert. Die Anzahl der Antikörper-bildenden Zellen wurde gemäß der in 3.4. beschriebenen Methode bestimmt. NRS (normal rabbit serum) und anti-Gammaglobulinserum wurden parallel verwendet.
Da zwei Tage nach Immunisierung nur 19 S-Antikörper auftreten (40), ergab sich aus der Differenz der Zahl Antikörper-bildender Zellen bei Objektträgern, die mit dem einen oder anderen Serum inkubiert, sonst aber gleich behandelt worden waren, der Prozentsatz der Hemmung. Die PFC-Zahl der mit NRS behandelten Objektträger wurde hierbei gleich 100% gesetzt.

3.3. Immunisierung

Herstellung der Hammelerythrozyten-Suspension wie in 3.2.1. beschrieben. Zur Immunisierung verwendet wurden verschiedene Anzahlen ($2x10^6$, $2x10^7$ $2x10^8$) SRBC pro Maus. Bei intraperitonealer Applikation des Antigens wurde die o. a. Menge in

0, 5 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, bei intravenöser Applikation in 0, 2 ml physiologischer Kochsalzlösung.

3. 4. Bestimmung der Anzahl Antikörper-bildender Zellen in der Milz

Nach Dekapitation wurden die Milzen sorgfältig herauspräpariert. gewogen und in 2-5 ml isotonen Mediums mit einer anatomischen Pinzette in einer Glasschale vorsichtig zerdrückt. Durch mehrmaliges Ansaugen und Auspressen des Inhalts mit einer Einmal-Spritze wurde eine möglichst homogene Suspension hergestellt. die anschließend durch ein 100-mash Stahlnetz filtriert wurde.

Zur Bestimmung der PFC in Anlehnung an eine Technik nach Jerne et al. (41) wurde ein bestimmtes Volumen (20-100 µl) der Suspension mit 0, 25 ml 0. 5%-iger Agarose-Medium-Lösung und 20 µl einer 2o%-igen SRBC-Suspension vermischt und auf einem wie o. a. vorbehandelten Objektträger gleichmäßig verteilt in der Weise. daß bei jedem Objektträger die bestrichene Fläche gleiche Ausmaße hatte. Sobald der Agar erstarrt war. wurden die Objektträger mit der beschichteten Seite nach unten auf eine Inkubationsplatte gelegt. in isotones Medium eingebettet und 90 min. bei 37°C inkubiert. danach auf anderen Platten entweder mit NRS oder anti-Gammaglobulinserum (verdünnt mit isotonem Medium) 60 min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden alle Objektträger in Komplement-haltiges Medium gelegt (Komplement und isotones Medium im Verhältnis 1:1)

und bei gleicher Temperatur weitere 60 min. inkubiert. Nun konnten die durch Hämolyse der Erythrozyten entstandenen Plaques bestimmt werden, die der Anzahl der Antikörper-bildenden Zellen entsprechen.
Nach Verdünnung eines Teils der oben beschriebenen Milzzellsuspensionen mit 3%-iger Essigsäure und auszählen in der Zählkammer nach Schilling, wurde nach entsprechender Umrechnung die Anzahl der kernhaltigen Zellen pro Milz ermittelt.

Beispiel für die Berechnung der PFC-Zahl bezogen auf die Milz bzw. auf 10^8 kernhaltige Milzzellen:

Gesamtvolumen der Milzzellsuspension:	2 ml
Für den Ausstrich entnommener Teil:	100 µl
Anzahl der PFC auf Objektträger I:	115
Objektträger II:	122
Arithmetisches Mittel der PFC	238 : 2 = 119

Da in 100 µl der Suspension 119 PFC enthalten waren, enthalten 2 ml 20 x 119 = 2380 PFC.
Angenommen die Gesamtzellzahl der Milz betrage 10×10^8 Zellen, so ergibt sich, bezieht man die Anzahl der PFC pro Milz auf 10^8 kernhaltige Milzzellen: $\frac{2380}{10 \times 10^8} = 238 \frac{\text{PFC}}{\text{Milzzellen}}$

3. 5. Bestimmung der Titer hämolysierender und hämagglutinierender Antikörper

Nachdem die Tiere dekapitiert und deren Blut mittels Glastrichtern in Kunsstoffgefäßen aufgefangen worden war. wurden durch mehrmaliges Zentrifugieren die Seren gewonnen und bei -18°C eingefroren.

Zur Bestimmung der Serumantikörper wurden die Seren frühestens 7 Tage nach dem Einfrieren wieder aufgetaut. Bei den zur Titerbestimmung hergestellten Verdünnungsreihen verhielten sich Serum und physiologische Kochsalzlösung wie 1:4, 1:8. 1:16 usw.. d. h.die Verdünnungen entsprachen $^{2}\log x$. Vor der Verdünnung wurden die Seren zur Bestimmung der Hämagglutinine 30 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. um das Eigenkomplement zu inhibieren.

Sollten 7 S-Antikörper bestimmt werden. dann wurden 0, 2 ml des konzentrierten Serums mit 0 2 ml 0. 1-molarer 2-Mercaptoäthanollösung vermischt und 3o min. bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Hämolysine und Hämagglutinine wurden jeweils 0, 2 ml der so behandelten Lösung benutzt. deshalb wurde bei der nun folgenden Verdünnung bereits von dem Verdünnungsverhältnis 1:8 ausgegangen. welches dem Titer 3 = $^{2}\log x$ entspricht.

Zur Bestimmung der 19 S- und 7 S-Antikörper wurden 0. 2 ml Serum mit 0 2 ml NaCl vermischt. d. h. es wurde von dem Verdünnungsverhältnis 1:4 ausgegangen.

Jedem Reagenzglas der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der

Hämolysine wurde ein gleiches Volumen (0, 2 ml einer Suspension, die sich zu gleichen Teilen aus 1%-iger SRBC-Suspension und 10%-iger Meerschweinchen-Komplementlösung zusammensetzte) hinzugegeben (42).

Nach kräftigem Schütteln wurden diese Reagenzgläser dann 1 Stunde bei 37°C inkubiert und die letzte positive Verdünnungsstufe ermittelt, d. h. das Reagenzglas, in dem eine Erythrozytenhämolyse gerade noch zu erkennen war. (43)

Zur Bestimmung der Hämagglutinine wurde jedem Reagenzglas der Verdünnungsreihe ein gleiches Volumen (0. 2 ml einer 0, 5%-igen SRBC-Suspension) zugegeben und durch Schütteln vermischt. Nachdem die Reagenzgläser 2 Stunden bei Raumtemperatur und ungefähr 10 Stunden im Kühlschrank bei +4°C gestanden hatten, wurden die Titer ermittelt. Dabei wurde die Verdünnungsstufe als letzte positive bewertet, bei der gerade noch ein scharf begrenzter Ring agglutinierter Erythrozyten zu erkennen war.

3.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Wilcoxen-Tests (44).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Applikation von SP_{54} im Verhältnis zum Zeitpunkt der Immunisierung

Wie Untersuchungen anderer Polyanionen wie z. B. Oxycellulose (7), Dextransulfat (3), Polymannuron-Guluronsäure (4), Polyacrylsäure (2), Poly-D-Glutamat, Poly-L-Glutamat (5), Polyriboadenylsäure, Polyribouridylsäure (1) gezeigt haben, ist die Wahl des Zeitpunkts zur Applikation des Polyanions im Verhältnis zum Zeitpunkt der Immunisierung neben anderen Faktoren von entscheidender Bedeutung für die Adjuvanswirkung dieser Substanzen.

Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Applikation von SP_{54} wurden Gruppen von je 6 Mäusen intraperitoneal 4 mg SP_{54} zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Immunisierung injiziert. 96 Stunden nach der Immunisierung mit suboptimaler Antigendosis (2×10^6 SRBC) wurde die Anzahl der Antikörper-bildenden Zellen und die Titer der hämolysierenden und hämagglutinierenden Antikörper bestimmt. Eine optimale Stimulierung ergab sich, wenn das Adjuvans 3o bis 15 min. vor dem Antigen injiziert wurde (Abbildung 2).

Bei den Antikörper-bildenden Zellen ergab sich sogar ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Werten zugunsten des 15 minütigen Zeitabstands. Während bei den meisten der bisher untersuchten Polyanionen die Adjuvanswirkung signifikant abfiel, wenn die Adjuvansgabe später als die Immunisierung erfolgte, zeigt dieser Versuch, daß bei einer Applikation von SP_{54} 24 Stunden nach Immunisierung

sowohl die Anzahl der Antikörper-bildenden Zellen als auch die Titer der hämagglutinierenden Antikörper signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht waren (Abbildung 3). Diese und vergleichbare Ergebnisse mit Polymannuron-Guluronsäure (4) lassen die Vermutung zu, daß zumindest für diese Polyanionen der Zeitraum weiter gefaßt werden muß, in dem diese in den Prozeß der Antikörperbildung eingreifen.

4.2. Dosisabhängigkeit der Wirkung von SP_{54} auf die Immunantwort

Um zu prüfen ob die Höhe der verwendeten Dosis SP_{54} als weiterer determinierender Faktor für den Grad der Adjuvanswirkung in Frage kommt, wurden Gruppen von je 6 Mäusen 15 min. vor Immunisierung mit der suboptimalen Antigendosis von 2×10^6 SRBC verschiedene Dosen des Adjuvans intraperitoneal injiziert.

In Bezug zur Kontrolle ergab sich für alle Dosen eine signifikante Erhöhung der Antikörper-bildenden Zellen (Abbildung 4). Untereinander jedoch ergaben sich bei den verwendeten Dosen keine signifikanten Unterschiede. Da die Letalität der Gruppe, die jeweils 12 mg SP_{54} pro Maus erhielt, 66% betrug, konnten diese Ergebnisse nicht mit in die statistische Berechnung einbezogen werden.
So stellt die Dosis von 4 mg SP_{54} die höchste und zugleich voll wirksame Dosis dar, während die rechnerisch ermittelten Vergleichswerte von 0,004 mg aus einem hier nicht dargestellten Nachversuch in Bezug zur Kontrolle keine sigifikante Erhöhung

der Antikörper-bildenden Zellen mehr ergeben.
Die Auswertung der Titer der hämolysierenden und hämagglutinierenden Antikörper ergibt eine optimale Stimulierung der Immunantwort durch die Dosis von 4 mg SP_{54} (Abbildung 5).
Der Vergleich mit anderen o. a. Polyanionen zeigt, was die Größenordnung der wirksamen Dosen angeht, vergleichbare Resultate.

4.3. Einfluß von SP_{54} auf die Stimulierung der Immunantwort bei Mäusen, die mit verschiedenen Dosen Antigen (SRBC) immunisiert wurden

Neben dem Einfluß des Zeitpunkts der Adjuvansgabe und der Höhe der verabreichten Dosis galt es zu klären, ob die hier untersuchte Substanz in Bezug auf die Stimulierung der Immunantwort eine ähnliche Abhängigkeit von der Antigendosis aufweist, wie sie bei anderen Polyanionen bereits nachgewiesen wurde (2, 3, 45).
Dazu wurden drei Gruppen von je 6 Mäusen mit 2×10^6, 2×10^7 und 2×10^8 SRBC intraperitoneal immunisiert. Weitere drei Gruppen von je 6 Mäusen wurden wie oben angeführt immunisiert, erhielten aber zusätzlich 15 min. vor Immunisierung 4 mg SP_{54} pro Maus intraperitoneal injiziert.
Antikörper-bildende Zellen und die Titer der hämolysierenden und hämagglutinierenden Antikörper wurden 96 Stunden später bestimmt.
Die Auswertung der in Abbildung 6 und 7 gezeigten Ergebnisse ergibt eine signifikante Stimulierung nur für die verwendete Antigendosis von 2×10^6 SRBC. Ebenso verhalten sich die Titer der häm-

agglutinierenden Antikörper, während die Titer der hämolysierenden Antikörper bei der Dosis von 2×10^7 SRBC noch einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und den mit SP_{54} behandelten Tieren aufweisen.
Jedoch ergibt auch bei den hämolysierenden Antikörpern die Antigendosis von 2×10^6 SRBC eine optimale Stimulierung der Immunantwort.

Folgende Überlegung führt zu einer möglichen Interpretation dieser Ergebnisse: Im Fall der humoralen Immunantwort auf Thymusabhängige Antigene könnte die Aufgabe der T-Zellen darin bestehen, nach Kontakt mit dem Antigen entweder selbst oder durch die Freisetzung einer Substanz mit möglicherweise mitogenen Eigenschaften die B-Zellen eines entsprechenden Klons zur Proliferation und/oder Differenzierung zu veranlassen. Die B-Zell-mitogenen Eigenschaften zahlreicher Adjuvantien (34, 35, 36, 37) scheinen die Voraussetzung für ihre Fähigkeit zu sein, T-Zell-Funktion zu ersetzen (32).
Bei einer wie in diesem Versuch verwendeten suboptimalen Antigendosis würden zu wenige T-Zellen aktiviert, die oben beschriebenen Funktionen aber von dem Adjuvans übernommen, was zu einer optimalen Stimulierung der Immunantwort führen würde. Bei optimal hohen Antigendosen hingegen würden ausreichende Mengen von T-Zellen aktiviert so daß eine zusätzliche Stimulierung der Immunantwort durch Adjuvantien nicht zu erwarten ist.

4.4. Einfluß des Applikationsweges von SP_{54} und SRBC auf die Stimulierung der Immunantwort

Ergebnisse mit Polymannuron-Guluronsäure (4), Dextransulfat (3), Polyacrylsäure (2) und Oxycellulose (7) haben zwar gezeigt, daß direkter Kontakt des Antigens mit dem Adjuvans keine unbedingte Voraussetzung für die Adjuvanswirkung ist, doch ergab sich zumindest für die Polyacrylsäure eine optimale Stimulierung der Immunantwort, wenn Antigen und Adjuvans auf demselben Weg appliziert wurden. Bei der Polyacrylsäure war die Stimulierung bei intravenöser Applikation sowohl des Antigens als auch des Adjuvans am größten.

Ähnliche Resultate lieferte dieser Versuch mit SP_{54}, bei dem durch Variation des Applikationsweges ein Vergleich aller Konstellationen angestellt werden konnte.

Die in Abbildung 8 gezeigten Ergebnisse ergaben eine optimale Stimulierung für die Fälle, in denen das Antigen und das Adjuvans auf dem gleichen Weg verabreicht wurden.

In diesem Zusammenhang sei auf einen Versuch hingewiesen, bei dem die Aufnahme von radioaktiv markiertem Antigen in die Milz ebenfalls dann am größten war, wenn Antigen und Adjuvans auf dem gleichen Weg verabfolgt wurden (46).

4. 5. Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Um den Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort zu untersuchen, wurden Gruppen von Mäusen intraperitoneal mit suboptimalen Antigendosen (2×10^6 SRBC) primärimmunisiert.

Ein Teil der Gruppen wurde 32 Tage später mit ebenfalls 2×10^6 SRBC, der andere Teil mit der optimalen Antigendosis von 2×10^8 SRBC sekundärimmunisiert (Kontrollgruppen).

Andere wie o. a. immunisierte Gruppen erhielten zusätzlich 15 min. vor Primär- und Sekundärimmunisierung 4 mg SP_{54} intraperitoneal (Versuchsgruppen).

Wie bereits Arbeiten mit anderen Polyanionen (2, 7) gezeigt haben bewirkt auch SP_{54} (Abbildung 9 und Tabelle 1) sowohl eine signifikante Erhöhung der direkten PFC bei der Primär- und Sekundärantwort der Gruppen, die suboptimal primär- und sekundärimmunisiert wurden als auch ein schnelleres Einsetzen und einen verstärkten Anstieg der Immunantwort. Dem verstärkten Anstieg der PFC entspricht nach dem Erreichen der Maxima ein schnellerer Abfall.

Während am 31. Tag nach Primärimmunisierung keine signifikante Erhöhung der 19 S-Antikörper-bildenden Zellen mehr vorhanden ist, ist die Anzahl der 7 S-Antikörper-bildenden Zellen noch signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht.

Absolut gesehen, werden in der Sekundärantwort von allen Gruppen höhere PFC-Werte erreicht als in der Primärantwort. Ähnliche Ergeb-

nisse zeigt die Abbildung 10, in der die PFC-Werte der Abbildung 9 auf 10^8 kernhaltige Milzzellen bezogen sind. Die Abbildung 11 zeigt in der Primär- und Sekundärantwort eine signifikante Erhöhung der hämolysierenden 19 S-Antikörpertiter der Versuchsgruppen.

Bei den hämolysierenden 7 S-Antikörpertitern ergab die Primärantwort keine signifikante Erhöhung, die Sekundärantwort lediglich am 8. Tag nach Sekundärimmunisierung, wohingegen ein Vergleich der Kontroll- und Versuchsgruppen untereinander einen deutlichen Titeranstieg der Sekundärantwort gegenüber der Primärantwort erkennen läßt.

Eine signifikante Erhöhung der hämagglutinierenden 19 S-Antikörpertiter im Vergleich zur Kontrolle ergab sich lediglich am 5. und 8. Tag der Sekundärantwort (Abbildung 12). Eine signifikante Erhöhung der hämagglutinierenden 7 S-Antikörpertiter erbrachte ebenfalls nur die Sekundärantwort. Die absolute Höhe der Titer ist ebenso wie bei den hämolysierenden Antikörpertitern während der Sekundärantwort deutlich erhöht.

Übereinstimmend zeigen beide Abbildungen den deutlich steilen Anstieg der hämolysierenden und hämagglutinierenden 7 S-Antikörpertiter sowohl der Kontroll- als auch der Versuchsgruppen am 2. Tag nach der Sekundärimmunisierung während die Primärantwort keine 7 S-Antikörpertiter aufweist.

Den Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der Sekundärantwort bei Mäusen, die als Zweitimmunisierung eine optimale Antigendosis von 2×10^8 SRBC erhielten, zeigen Abbildung 13 und Tabelle 2. Zwar

zeigt die Kinetik einen steilen Anstieg sowohl der direkten als auch der indirekten PFC und größere Maxima als die Primärantwort, eine signifikante Stimulierung der Immunantwort durch SP_{54} wie sie in Abbildung 9 gezeigt wird, ergibt sich hier nur in einem Fall (7 S-PFC, 37. Tag). Abbildung 14 bezieht die Anzahl der PFC auf 10^8 kernhaltige Milzzellen und zeigt ähnliche Ergebnisse.

Dieser Versuch zeigt, daß eine Stimulierung der Immunantwort durch SP_{54} auch in der Sekundärantwort nicht erreicht wird, wenn mit optimalen Antigendosen immunisiert wird.

Die hämolysierenden und hämagglutinierenden (Abbildung 15, 16) 19 S- und 7 S-Antikörpertiter zeigen ebenfalls einen deutlichen Anstieg, ein hohes Maximum und lediglich in 4 Fällen eine Stimulierung durch SP_{54} (Tabelle 3).

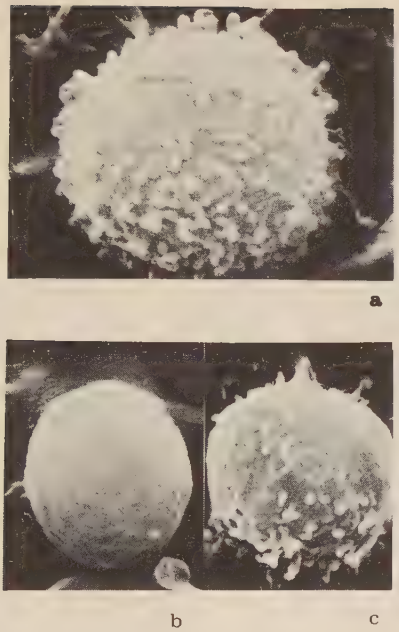
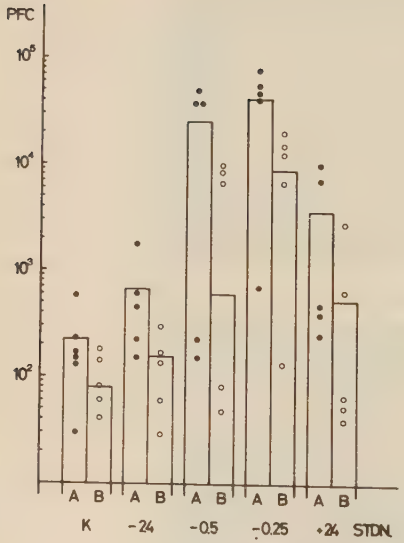
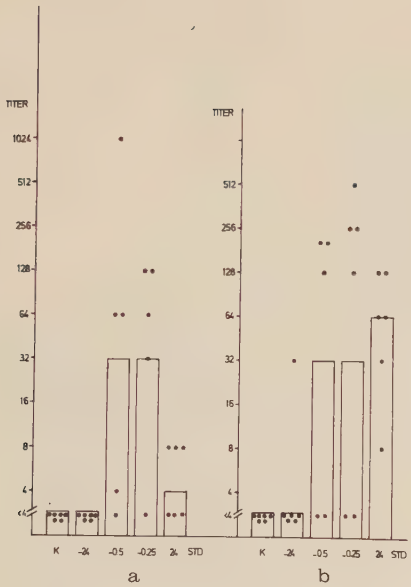


Abbildung 1: Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahme einer typischen B-Zelle mit dichtem Zottenbesatz ihrer Zelloberfläche (a), links darunter eine T-Zelle mit relativ glatter Oberfläche (b), daneben eine T-Zelle mit einer relativ großen Zahl von Zotten auf ihrer Zelloberfläche (c).
Die Aufnahmen sind einer Arbeit von A. Polliack et al. (19) entnommen.



	-24	-0.5	-0.25	+24
K	NS	NS	0.01	0.10
-24	X	0.10	NS	NS
-0.5		X	0.10	NS
-0.25			X	0.05

Abbildung 2: **Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Applikation** von SP_{54} im Verhältnis zum Zeitpunkt der Immunisierung
Gruppen von je 6 Mäusen wurden zum Zeitpunkt t = 0 mit 2×10^6 SRBC immunisiert und erhielten zu verschiedenen Zeiten vor oder nach der Immunisierung 4 mg SP_{54} intraperitoneal oder kein Adjuvans. K = ohne SP_{54} immunisierte Mäuse, ●(A) = PFC/Milz, O(B) = PFC/10^8 kernhaltige Milzzellen. Neben der Abbildung die Signifikanztabelle zu den PFC/Milz.



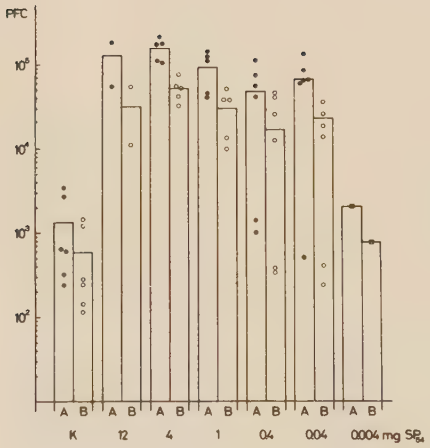
	-24	-0.5	-0.25	+24
K	NS	0.10	0.10	NS
-24	X	0.10	0.10	NS
-0.5		X	NS	NS
-0.25			X	NS

a

	-24	-0.5	-0.25	+24
K	NS	NS	0.10	0.01
-24	X	NS	0.10	0.01
-0.5		X	NS	NS
-0.25			X	NS

b

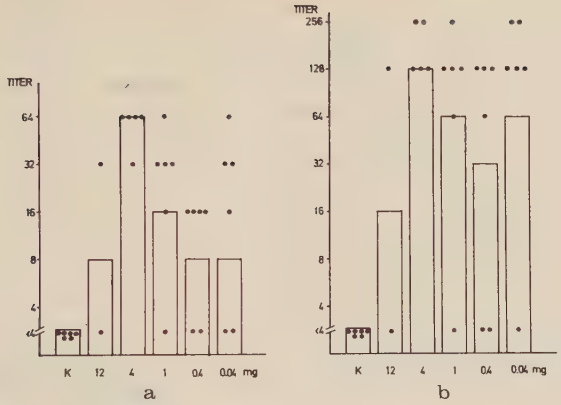
Abbildung 3: Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Applikation von SP_{54} im Verhältnis zum Zeitpunkt der Immunisierung
Titer der hämolysierenden (a) und hämagglutinierenden (b) Serumantikörper. Versuchsanordnung wie im Text zu Abbildung 2 beschrieben. Neben der Abbildung die Signifikanztabellen der Titer der hämolysierenden (a) und hämagglutinierenden (b) Serumantikörper.



	12	4	1	0.4	0.04
K	X	0.01	0.01	0.05	0.05
12	X	X	X	X	X
4		X	NS	NS	NS
1			X	NS	NS
0.4				X	NS

Abbildung 4: Dosisabhängigkeit der Wirkung von SP_{54} auf die Immunantwort

Gruppen von je 6 Mäusen erhielten 15 min. vor Immunisierung mit 2 x 10^6 SRBC verschiedene Dosen SP_{54}. Bestimmung der Antikörper-bildenden Zellen und der Titer der hämolysierenden und hämagglutinierenden Antikörper wie im Text zu Abbildung 2 beschrieben. K = ohne SP_{54} immunisierte Tiere, ●(A) = PFC/Milz, ○(B) = PFC/10^8 kernhaltige Milzzellen, ■□ = errechnete Vergleichsgrößen aus einem hier nicht aufgeführten Nachversuch. Neben der Abbildung die Signifikanztabelle zu den PFC/Milz.



	12	4	1	0.4	0.04
K	X	0.01	0.01	NS	NS
12	X	X	X	X	X
4		X	NS	NS	NS
1			X	NS	NS
0.4				X	NS

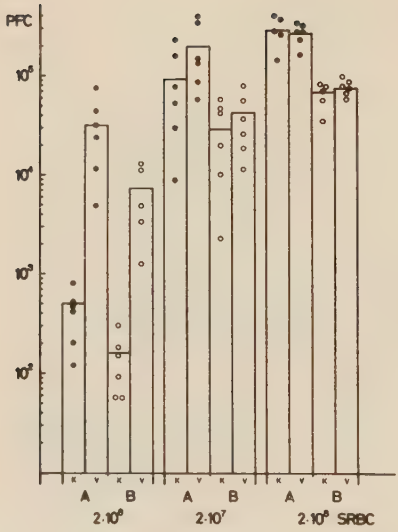
a

	12	4	1	0.4	0.04
K	X	0.01	0.05	NS	0.05
12	X	X	X	X	X
4		X	NS	NS	NS
1			X	NS	NS
0.4				X	NS

b

Abbildung 5: Dosisabhängigkeit der Wirkung von SP_{54} auf die Immunantwort

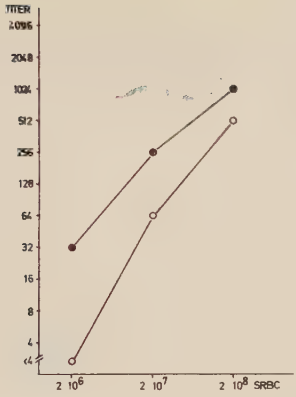
Titer der hämolysierenden (a) und hämagglutinierenden (b) Serumantikörper. Versuchsanordnung wie im Text zu Abbildung 4 beschrieben. Unter der Abbildung die Signifikanztabellen der Titer der hämolysierenden (a) und hämagglutinierenden (b) Serumantikörper.



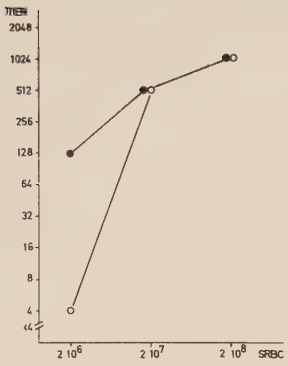
	10^8	10^7 K	10^7	10^6 K	10^6
10^8 K	NS	0.02	NS	0.01	0.01
10^8	X	0.02	NS	0.01	0.01
10^7 K		X	NS	0.01	NS
10^7			X	0.01	0.01
10^6 K				X	0.01

Abbildung 6: Einfluß von SP_{54} auf die Stimulierung der Immunantwort bei Mäusen, die mit verschiedenen Dosen Antigen (SRBC) immunisiert wurden

Drei Gruppen (V) von jeweils 6 Mäusen erhielten 15 min. nach Applikation des Adjuvans 2×10^6, 2×10^7 und 2×10^8 SRBC zur Immunisierung. Drei weitere Gruppen von jeweils 6 Mäusen wurden wie oben beschrieben immunisiert, erhielten aber kein Adjuvans (K). Bestimmung der PFC und der Titer der Serumantikörper wie im Text zu Abbildung 2 beschrieben. ●(A) = PFC/Milz, ○(B) = PFC/10^8 kernhaltige Milzzellen. Neben der Abbildung die Signifikanztabelle zu den PFC/Milz.



a



b

	10^8	10^7 K	10^7	10^6 K	10^6
10^8 K	NS	0.01	NS	0.01	0.01
10^8	X	0.01	NS	0.01	0.01
10^7 K		X	0.10	0.01	0.01
10^7			X	0.01	0.01
10^6 K				X	0.01

a

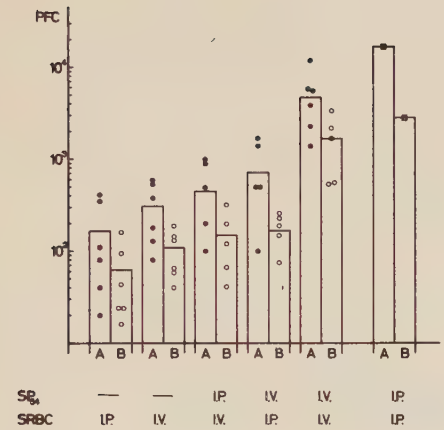
	10^8	10^7 K	10^7	10^6 K	10^6
10^8 K	NS	NS	NS	0.02	0.01
10^8	X	0.01	NS	0.01	0.01
10^7 K		X	NS	0.01	0.01
10^7			X	0.01	0.01
10^6 K				X	0.01

b

Abbildung 7: Einfluß von SP_{54} auf die Stimulierung der Immunantwort bei Mäusen, die mit verschiedenen Dosen Antigen (SRBC) immunisiert wurden

Titer der hämolysierenden (a) und hämagglutinierenden (b) Serumantikörper. Versuchsanordnung wie im Text zu Abbildung 6 beschrieben. ●= Gruppen von Mäusen, die zusätzlich zum Antigen

4 mg SP_{54} erhielten, O= Gruppen von Mäusen, die kein SP_{54} erhielten. Unter der Abbildung die Signifikanztabellen der hämolysierenden (a) und hämagglutinierenden (b) Serumantikörper.



	II	III	IV	V
I	NS	NS	0.01	0.01
II	X	NS	NS	0.01
III		X	NS	0.01
IV			X	0.01

Abbildung 8: Einfluß des Applikationsweges von SP_{54} und SRBC auf die Stimulierung der Immunantwort

Zur Immunisierung erhielten Gruppen von je 6 Mäusen 2 x 10^6 SRBC intraperitoneal oder 2 x 10^5 SRBC intravenös. 4 dieser Gruppen erhielten 15 min. vor Immunisierung 4 mg SP_{54} intraperitoneal bzw. intravenös. 2 Gruppen erhielten kein SP_{54}. ●(A) = PFC/Milz, O(B) = PFC/10^8 kernhaltige Milzzellen, ■□ = errechnete Vergleichswerte aus einem hier nicht dargestellten Versuch. Neben der Abbildung die Signifikanztabelle zu den PFC/Milz. Die in der Abbildung aufgeführten Gruppen sind mit römischen Ziffern fortlaufend numeriert.

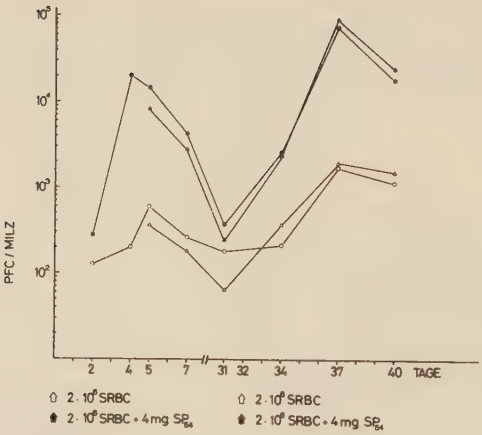


Abbildung 9: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Gruppen von je 7 Mäusen wurden intraperitoneal mit 2 x 10^6 SRBC primärimmunisiert und 32 Tage später mit 2 x 10^6 SRBC sekundärimmunisiert. (○△) Andere Gruppen erhielten zusätzlich jeweils 15 min. vor Erst- und Zweitimmunisierung 4 mg SP_{54} intraperitoneal. (●▲) Bestimmt wurden 19 S-(●○) und 7 S-(▲△) Antikörper-bildende Zellen.

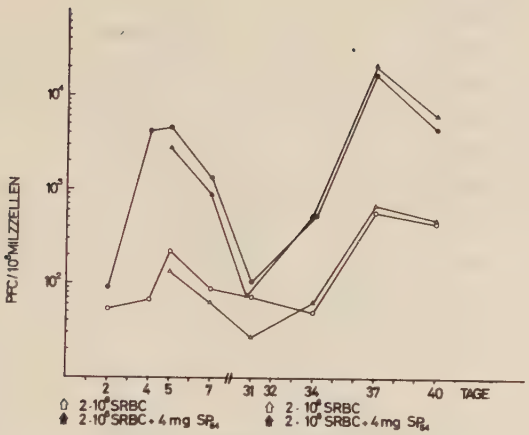


Abbildung 10: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Die in Abbildung 9 gezeigten Ergebnisse wurden auf 10^8 kernhaltige Milzzellen bezogen. Die Symbole wurden entsprechend verwendet.

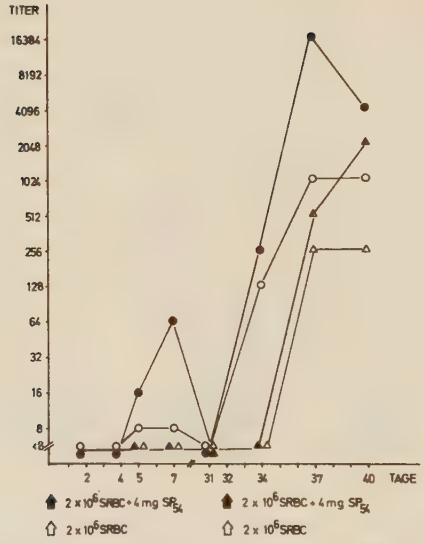


Abbildung 11: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Titer der hämolysierenden Serumantikörper. Versuchsanordnung wie im Text zu Abbildung 9 beschrieben. Die Symbole wurden entsprechend verwendet.

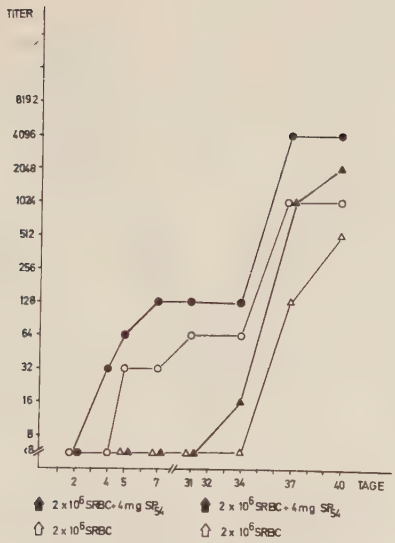


Abbildung 12: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Titer der hämagglutinierenden Serumantikörper. Versuchsanordnung wie im Text zu Abbildung 9 beschrieben. Die Symbole wurden entsprechend verwendet.

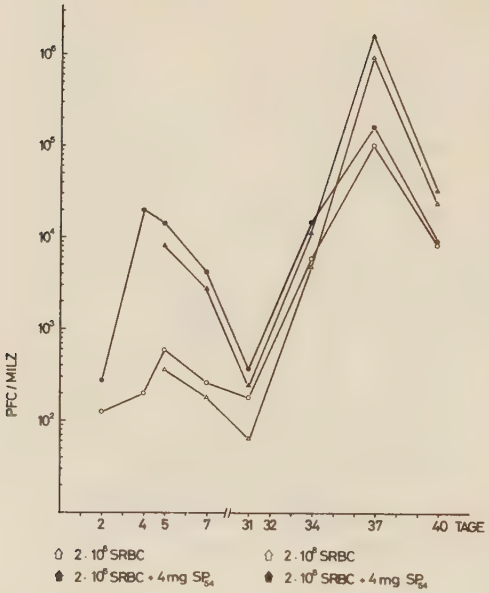


Abbildung 13: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Versuchsanordnung wie im Text zu Abbildung 9 beschrieben. Jedoch erhielten die Gruppen bei der Zweitimmunisierung die optimale Antigendosis von 2 x 10^8 SRBC.

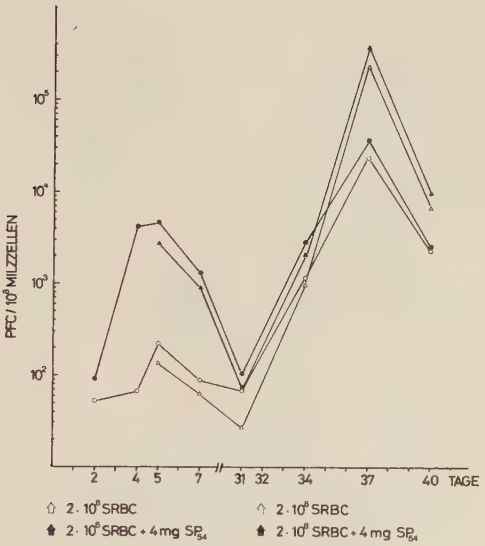


Abbildung 14: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Die in Abbildung 13 gezeigten Ergebnisse wurden auf 10^8 kernhaltige Milzzellen bezogen. Die Symbole wurden entsprechend verwendet.

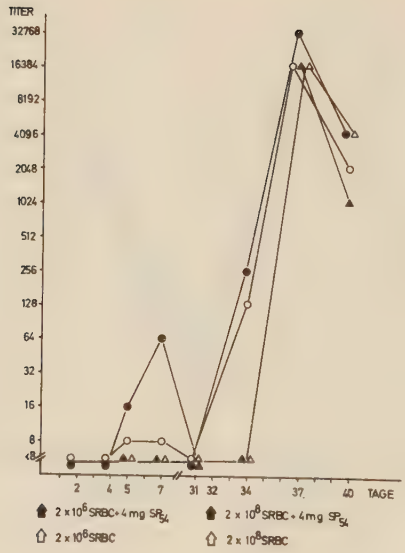


Abbildung 15: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Titer der hämolysierenden Serumantikörper. Versuchsanordnung wie im Text zu Abbildung 13 beschrieben. Die Symbole wurden entsprechend verwendet.

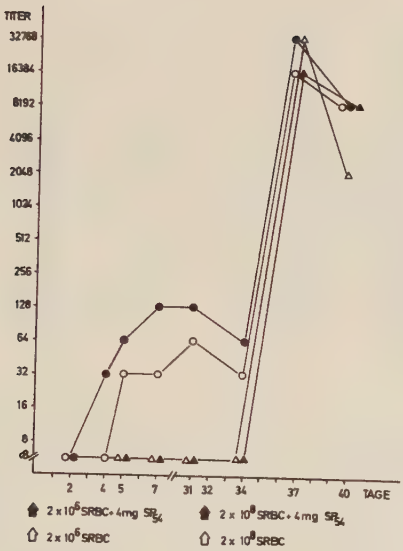


Abbildung 16: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Titer der hämagglutinierenden Serumantikörper. Versuchsanordnung wie im Text zu Abbildung 13 beschrieben. Die Symbole wurden entsprechend verwendet.

PFC PRO MILZ

TAGE NACH PRIMÄRIMMUNISIERUNG	19 S			7 S		
	A	B	p	A	B	p
2	128 (30-270)	281 (40-480)	N. S.			
4	202 (60-420)	20 500 (4 700-64 000)	0.01			
5	601 (30-2 040)	14 350 (4 760-20 800)	0.01	366 (18-755)	8 490 (2 278-16 024)	0.01
7	266 (60-820)	4 214 (2 300-10 000)	0.01	186 (22-504)	2 750 (918-5 420)	0.01
31	182 (100-290)	374 (40-860)	N. S.	67 (5-175)	252 (6-520)	0.10
	C	D		C	D	
34	214 (80-620)	2 560 (440-9 660)	0.01	379 (99-722)	2 475 (696-6 260)	0.01
37	1 700 (700-5 960)	73 900 (21 500-132 000)	0.01	1 978 (411-7 639)	92 900 (5 784-161 460)	0.01
40	1 161 (200-4 100)	17 364 (850-41 550)	0.01	1 433 (86-4 113)	24 074 (1 250-56 637)	0.01

Tabelle 1: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Gruppen von je 7 Mäusen erhielten primär 2 x 10^6 SRBC (A), primär 2 x 10^6 SRBC und 15 min. vorher 4 mg SP_{54} (B), primär 2 x 10^6 SRBC und sekundär (32. Tag) 2 x 10^6 SRBC (C), primär 2 x 10^6 SRBC und 15 min. vorher 4 mg SP_{54}, sekundär 2 x 10^6 SRBC und 15 min. vorher 4 mg SP_{54} (D). Unter den Großbuchstaben sind die errechneten Mittelwerte der PFC/Milz (in Klammern die Abweichungen) für die jeweiligen Tage nach Primärimmunisierung angegeben.

Die Signifikanzangaben (Spalte unter p) beziehen sich auf einen Vergleich der Gruppen des betreffenden Tages.

TAGE NACH PRIMÄRIMMUNISIERUNG	PFC PRO MILZ						
	19 S			7 S			
	E	F	p	E	F	p
34	5 943 (3 200–9 200)	14 685 (3 400–33 400)	N. S.	4 849 (2 276–12 334)	11 066 (1 002–27 902)	N. S.
37	97 500 (15 000–247 000)	157 500 (37 500–422 500)	N. S.	934 100 (306 700–1 833 350)	1 603 500 (778 412–2 408 887)	0. 10
40	8 390 (2 500–27 500)	8 930 (2 500–13 750)	N. S.	24 270 (7 062–62 075)	33 919 (5 300–67 287)	N. S.

Tabelle 2: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Gruppen von je 7 Mäusen erhielten primär 2 x 10^6 SRBC und sekundär 2 x 10^8 SRBC (E), primär 2 x 10^6 SRBC und 15 min. vorher 4 mg SP_{54}, sekundär 2 x 10^8 SRBC und 15 min. vorher 4 mg SP_{54} (F). Unter den Großbuchstaben sind die errechneten Mittelwerte der PFC/Milz (in Klammern die Abweichungen) für die jeweiligen Tage nach Primärimmunisierung angegeben. Die Signifikanzangaben (Spalte unter p) beziehen sich auf einen Vergleich der Gruppen des betreffenden Tages.

TAGE NACH PRIMÄRIMMUNISIERUNG	I				II			
	19S		7S		19S		7S	
	$10^6/10^5$	$10^6/10^3$	$10^6/10^5$	$10^6/10^3$	$10^6/10^5$	$10^6/10^3$	$10^6/10^5$	$10^6/10^3$
2	NS	—	—	—	NS	—	—	—
4	0.10	—	—	—	NS	—	—	—
5	NS	—	NS	—	NS	—	NS	—
7	0.01	—	NS	—	NS	—	NS	—
31	NS	—	NS	—	NS	—	NS	—
34	0.10	0.05	NS	NS	NS	NS	0.10	0.01
37	0.01	NS	NS	NS	0.01	NS	0.02	NS
40	0.05	NS	0.10	0.02	0.02	NS	0.01	0.10

Tabelle 3: Einfluß von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort

Statistische Auswertung der in den Abbildungen 11 und 15 dargestellten Kinetik der hämolysierenden Serumantikörper (I) und der in den Abbildungen 12 und 16 dargestellten Kinetik der hämagglutinierenden Serumantikörper (II).

Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf einen Vergleich der beiden Gruppen des jeweiligen Tages, von denen die eine Antigen und Adjuvans, die andere lediglich Antigen erhalten hatte.

5. Zusammenfassung

Die Untersuchung des Einflusses von Pentosansulfat auf die humorale Immunantwort von Mäusen gegen Hammelerythrozyten zeigte folgende Ergebnisse:

SP_{54} erhöht ebenso wie eine Reihe anderer chemisch verwandter Substanzen (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) die humorale Immunantwort gegen Hammelerythrozyten, wenn die Tiere mit suboptimalen Antigendosen immunisiert werden.

Eine optimale Stimulierung ergab sich, wenn das Adjuvans 30 bis 15 min. vor dem Antigen injiziert wurde. Die Titer der hämolysierenden und hämagglutinierenden Antikörper zeigen vergleichbare Ergebnisse. Im Gegensatz zu anderen Polyanionen bewirkte die Applikation von SP_{54} 24 Stunden nach Immunisierung noch eine signifikante Erhöhung der Antikörper-bildenden Zellen und der Titer der hämagglutinierenden Antikörper.

Die verwendeten Dosen von 0,04; 0,4; 1 und 4 mg SP_{54}/Maus ergaben eine optimale Erhöhung der Antikörper-bildenden Zellen, ohne in der Wirkung untereinander signifikant unterschiedlich zu sein.

Die Auswertung der Titer der hämolysierenden und hämagglutinierenden Antikörper ergab eine optimale Stimulierung der Immunantwort durch die Dosis von 4 mg SP_{54}.

Bei Verwendung verschiedener Dosen Antigen ergab sich eine signifikante Erhöhung nur für die verwendete suboptimale Antigendosis von 2×10^6 SRBC.

Bei Variation des Applikationsweges von SP_{54} und SRBC ergab sich

eine optimale Stimulierung für die Fälle, in denen Antigen und Adjuvans auf dem gleichen Weg verabreicht wurden.

Die Untersuchung des Einflusses von SP_{54} auf die Kinetik der primären und sekundären Immunantwort ergab sowohl eine signifikante Erhöhung der 19 S- und 7 S-Antikörper-bildenden Zellen in der Primär- und Sekundärantwort der Gruppen, die suboptimal primär- und sekundärimmunisiert wurden, als auch ein schnelleres Einsetzen und einen verstärkten Anstieg der Immunantwort.

Außerdem wurden in der Sekundärantwort - absolut gesehen - von allen Gruppen höhere PFC-Werte erreicht als in der Primärantwort.

Die hämolysierenden 19 S-Antikörpertiter zeigten ebenfalls in der Primär- und Sekundärantwort eine signifikante Erhöhung, die 7 S-Antikörpertiter lediglich am 8. Tag nach Sekundärimmunisierung.

Die hämagglutinierenden 19 S- und 7 S-Antikörpertiter ergaben nur in der Sekundärantwort signifikante Erhöhungen.

Die Untersuchung des Einflusses von SP_{54} auf die Kinetik der Sekundärantwort bei Mäusen, die als Zweitimmunisierung eine optimale Antigendosis von 2×10^8 SRBC erhielten, ergab dagegen keine signifikante Stimulierung der Immunantwort.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Adjuvanseigenschaften des Polyanions SP_{54} denen anderer Polyanionen vergleichbar sind. Ein hohes Molekulargewicht ist demnach keine unbedingte Voraussetzung für die Adjuvanswirkung eines Polyanions.

6. Literaturverzeichnis

1. W. Braun, M. Nakano, L. Jaraskova, Y. Yajima, L. Jiminez — Nucleic Acids in Immunology Eds. O.J. Plescia and W. Braun; Springer-Verlag Inc., New York 1968, p. 347
2. T. Diamantstein, B. Wagner, M.V. Odenwald und G. Schulz — The effect of polyacrylic acid on the immune response in mice immunized with sheep red blood cells Eur. J. Immunol. 1971, 1: 335
3. T. Diamantstein, B. Wagner, I. Beyse, M.V. Odenwald und G. Schulz — The influence of sulfate esters of polymers on the immune response in mice Eur. J. Immunol. 1971, 1: 340
4. T. Diamantstein, G. Odenwald und D. Odenwald — Stimulation of immune response by polymannuronic-guluronic acid in mice Experientia 1971, 27: 953
5. R. Malchus — Erhöhung der Immunantwort von Mäusen auf SRBC durch Poly-D-Glutaminsäure und Poly-L-Glutaminsäure Inaugural Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an den Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin, 1974

6. J. Kielmann — Untersuchung des Einflusses von Polyäthylensulfat auf die humorale Immunantwort bei der Maus Inaugural Dissertation zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin, 1973

7. R. Schmüderrich — Stimulierung der humoralen Immunantwort durch oxydierte Cellulose Inaugural Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an den Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin, 1974

8. T. Diamantstein — unveröffentlichte Ergebnisse

9. A.K. Field, A.A. Tytell, G.P. Lampson und M.R. Hillemann — Inducers of interferon and host resistance Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1967, 58: 1004

10. J.S. Remington und T.C. Merigan — Synthetic polyanions protect mice against intracellular bacterial infection Nature, London 1970, 226: 361

11. N. Schramm-Thiel, R. Freiskorn, M. Kettner, — Makromolekulare Virus-hemmende Substanzen und ihre Interferon indu-

G. May und A. Wacker — zierende Aktivität
Arzneim.-Forsch. 1971, 21: 1389

12. D. Walb, M. Loos und U. Hadding — Antikomplementäre Wirkung eines semisynthetischen Pentosan-Polysulfo-Esters
Zeitschr. f. Naturforsch. 1971, 26: 403

13. D.A. Kalbhen, H. Clausen und R. Domenjoz — Erste Untersuchungen zur entzündungshemmenden Wirkung von Pentosanpolysulfat auf verschiedene Ödemformen der Rattenpfote
Arzneim.-Forsch. 1970, 20: 1872

14. G.F. Mitchell and J.F. A.P. Miller — The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes
J. Exp. Med. 1968, 128: 821

15. J.F.A.P. Miller and G.F. Mitchell — Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphozytes
J. Exp. Med. 1968, 128: 801

16. N. Claman, E.A. Chaperon and R.F. Triplett — Immunocompetence of transferred thymus-marrow cell combinations
J. Immunol. 1966, 97: 828

17. G.J.V. Nossal, A. Cun- — Chromosomal marker analysis of

ningham, G.V. Mitchell and J.F.A.P. Miller — single antibody-forming cells in reconstituted, irradiated, or thymectomized mice
J. Exp. Med. 1968, 128: 839

18. J.F.A.P. Miller and G.V. Mitchell — Thymus and antigen reactive cells
Transplant. Rev. 1969, 1: 3

19. A. Polliack, N. Lampen, B.D. Clarkson and E. de Harven — Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy
J. Exp. Med. 1973, 138: 607

20. M.A.S. Moore and J.J.T. Owen — Stem-cell migration in developing myeloid and lymphoid systems
Lancet 1967, 2: 658

21. J.F.A.P. Miller and D. Osoba — Current concepts of the immunological function of the thymus
Physiol. Rev. 1967, 47: 437

22. R.B. Taylor — Cellular cooperation in the antibody response of mice to two serum albumins
Transplant. Rev. 1969, 1: 114

23. J.F.A.P. Miller — Immunological function of the thymus
Lancet 1961, 2: 748

24. G.F. Mitchell and J.F.A.P. Miller — Immunological activity of thymus and thoracic duct lymphocytes
Proc. Nat Acad. Sci. U.S. 1968, 59: 296

25. R.B. Taylor and H.H. Wortis — Thymus dependence of antibody response: variation with dose of antigen and class of antibody
Nature, London 1968, 220: 927

26. J.H. Humphrey, D.M.V. Parrot and J. East — Studies on globulin and antibody production in mice thymectomized at birth
Immunology 1964, 7: 419

27. W.D. Armstrong, E. Diener and G.R. Shellam — Antigen-reactive cells in normal, immunized and tolerant mice
J. Exp. Med. 1969, 129: 393

28. B. Andersson and H. Blomgren — Evidence for thymus-independent humoral antibody production in mice against polyvinylpyrrolidone and E. coli lipopolysaccharide
Cell. Immunol. 1971, 2: 411

29. R.S. Basch — Immunologic competence after thymectomy
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1966, 30: 105

30. J.R. Schmidtke and E.R. Unanue — Macrophage-antigen-interaction: Uptake, metabolism and immunogenicity of foreign albumin
J. Immunol. 1971, 107: 331

31. A. Basten, J.F.A.P. Miller, N.L. Warner and J. Pye — Specific inactivation of thymus-derived (B) lymphocytes by ^{125}I-labelled antigen

Natur New Biol. 1971, 231: 104

32. T. Diamantstein, B. Wagner, J. L'Age-Stehr, I. Beyse, M.V. Odenwald and G. Schulz — Restoration of the immune response to sheep red blood cells by polyanions in thymectomized and lethally irradiated mice protected with bone marrow cells
Eur. J. Immunol. 1971, 1: 302

33. R. Dörries, A. Schimpl und E. Wecker — Action of dextran sulfate as a direct and general B cell mitogen
Eur. J. Immunol. 1974, 4: 230

34. T. Diamantstein, H. Rühl, W. Vogt und G. Borchert — Stimulation of B cells by DS in vitro
Immunology 1973, 25: 743

35. T. Diamantstein, W. Vogt, H. Rühl und G. Borchert — Stimulation of DNA-synthesis in mouse lymphoid cells by polyanions in vitro. I. Target cells and possible mode of action
Eur. J. Immunol. 1973, 3: 488

36. W. Vogt, H. Rühl, B. Wagner und T. Diamantstein — Stimulation of DNA-synthesis in mouse lymphoid cells by polyanions in vitro. II. Relationship between adjuvant activity and stimulation of DNA-synthesis by polyanions
Eur. J. Immunol. 1973, 3: 493

37. H. Rühl, W. Vogt, G. Borchert and T. Diamantstein — Stimulation of B cells by polyadenylic-polyuridylic acid and polyinosinic-polycytidylic acid in vitro
Immunology 1974, 26: 937

38. A. Coutinho, E. Gronowicz, W.W. Bullock and G. Möller
Mechanism of thymus-independent immunocyte triggering. Mitogenic activation of B cells results in specific immune responses
J. Exp. Med. 1974, 74: 139

39. A. Coutinho, G. Möller, J. Andersson and W.W. Bullock
In vitro activation of mouse lymphocytes in serum free medium: Effect of T and B cell mitogens on proliferation and antibody synthesis
Eur. J. Immunol. 1973, 3: 299

40. S.J. Black and C.J. Inchley
Characteristics of immunological memory in mice. I. Seperate early generation of cells mediating IgM and IgG memory to sheep erythrocytes
J. Exp. Med. 1974, 140: 335

41. N.K. Jerne, A.A. Nordin und C. Henry
Cell bound antibodies
Edited by B. Amos and H. Koprowski
The Wistar Institute Press, Philadelphia 1963, 109

42. T. Sabet, C. Newlin and H. Friedmann
Effects of RES "blockade" on antibody formation
Immunology 1969, 16: 433

43. A.B. Stavitsky
Micromethods for the study of proteins and antibodies
J. Immunol. 1954, 73: 360

44. L. Sachs — Statistische Auswertungsmethoden
Springer-Verlag, Berlin 1968, 312

45. T. Diamantstein B. Wagner, I. Beyse und M. V. Odenwald — Zum Mechanismus der Stimulierung der humoralen Antikörperbildung durch Polyanionen
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 1970, 8:632

46. T. Diamantstein, H. Meinhold und B. Wagner — Relationship between enhancement of sheep red blood cell uptake by the spleen and adjuvant action of dextran sulfate
Eur. J. Immunol. 1971, 1: 429

Herrn Professor Dr. T. Diamantstein danke ich für die Überlassung des Themas und seine wertvolle Unterstützung bei dessen Bearbeitung. Herrn R. Malchus, Frau A. Stork, Fräulein G. Schulz, Fräulein M. V. Odenwald und Fräulein G. Lützenkirchen danke ich für ihre Hilfe bei der praktischen Laborarbeit.

Lebenslauf

Am 2. 10. 1946 wurde ich, Clemens Stork, als zweites Kind des Kaufmannes Constantin Stork und seiner Ehefrau Christine, geb. Ortkraß, in Herzebrock/Westf. geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Luise-Hensel-Volksschule in Gütersloh. Von 1957 an besuchte ich das Städtische Gymnasium in Wiedenbrück, wo ich am 24.2. 1966 die Reifeprüfung ablegte.
Nach Ableistung einer 18 monatigen Wehrdienstzeit und 2 Semestern Archtekturstudium an der TU Stuttgart begann ich am 31. 10. 1968 das Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin.
Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich am 4. 9. 1969 die ärztliche Vorprüfung am 22. 3. 1971 und das medizinische Staatsexamen am 22. 8. 1974 ab.
Seit dem 28. 12. 1972 bin ich mit Frau Angelika Stork, geb. Bremer, verheiratet.
Nach der Medizinalassistentenzeit beabsichtige ich, mit einer Facharztausbildung zu beginnen.